

氏名・(本籍)	藤田 啓 (北海道)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 1068 号
学位授与の日付	令和 4 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Peritumoral CD16b positive neutrophil accumulation strongly correlates with regional lymph node metastasis in thoracic esophageal squamous cell cancer (腫瘍辺縁の CD16b 陽性好中球の集積は胸部食道扁平上皮癌の領域内リンパ節転移と強く相関する)
論文審査委員	(主査) 大森 泰文 教授 (副査) 田中 正光 教授 羽瀧 友則 教授

学 位 論 文 内 容 要 旨

Peritumoral CD16b positive-neutrophil accumulation strongly correlates with regional lymph node metastasis in thoracic esophageal squamous cell cancer

(腫瘍辺縁の CD16b 陽性好中球の集積は胸部食道扁平上皮癌の領域内リンパ節転移と強く相関する)

申請者氏名 藤田 啓

研 究 目 的

リンパ節転移を伴う進行食道癌の予後は極めて不良である。しかし領域内リンパ節転移は遠隔臓器あるいはリンパ節転移と異なり、術前後の補助療法および手術治療により根治を望める。このためリンパ節転移のメカニズム解明とその制御は外科医にとって関心が高い研究分野であった。一般的に、腫瘍周囲のリンパ管を介して腫瘍細胞が領域リンパ節へと転移するため、腫瘍周囲の免疫・炎症反応がリンパ節転移に関与していることは明らかである。しかし、その詳細なメカニズム解明には未だ至っていない。今回、我々は動物実験で得られた、領域リンパ節転移が腫瘍辺縁への好中球集積と関与しているとの知見を臨床病理学的に検証した。

研 究 方 法

秋田大学医学部附属病院で 2010 年から 2019 年までの間に、根治手術が行われた胸部食道扁平上皮癌患者で、術前治療症例を除く、126 名の腫瘍組織検体から作製したパラフィンブロックを用いて、抗好中球抗体の一つである CD16b 抗体(LsBio 社)の組織免疫染色を行った。1 検体毎に腫瘍組織と間質組織の両方を含む 3 視野を選択し、それぞれの視野で間質組織の面積を測定し、そのうち CD16 抗体陽性好中球が占める割合を計測ソフト(BZ-X analyzer(Keyence 社))を用いて機械的に算出した。3 視野の CD16b 抗体陽性好中球が占める割合を合計し、その検体の「CD16b スコア」としてスコア化した。単変量・多変量解析を行い、CD16b スコアと領域内リンパ節転移(pN)との相関を検討した。また、ROC 曲線を用いた解析で、CD16b スコア 11 以上を高値群、11 未満を低値群とし、各群の 5 年生存率、好中球/リンパ球比等との関連性等について解析した。さらに、上記 126 名のうちリンパ節転移陽性であった 5 名の組織マイクロアレイ検体を用いて CD16 抗体の組織免疫染色を行い、それぞれ 3 視野ずつ、腫瘍辺縁部と同様に腫瘍内部の CD16 抗体陽性好中球の割合の評価を行い、腫

瘍辺縁と腫瘍内部における CD16b 抗体陽性好中球の集積の度合いを比較検討した。

研 究 成 績

腫瘍辺縁部における CD16b スコアはリンパ節転移陽性群において有意に高値（中央値：15(高値群)、5(低値群)）であった($p < 0.001$)。単変量および多変量解析では CD16b スコア高値は食道扁平上皮癌のリンパ節転移に対する独立した因子であった(オッズ比 25.44, $p < 0.001$)。また、Kaplan-Meier 法を用いて行った生存解析では、CD16b スコア高値群では有意に 5 年生存率が低かった ($p = 0.010$)。一方、全身性炎症の指標となると言われていると好中球/リンパ球比と CD16b スコアとの有意な相関は認められなかった。なお、リンパ節転移陽性患者において腫瘍辺縁部と中心部に近い腫瘍内部の間質を比較したところ、腫瘍辺縁部の方が CD16b 抗体陽性好中球の集積が強い傾向にあった。(中央値：15(腫瘍辺縁部)、0.2(腫瘍内部))

結 論

胸部食道扁平上皮癌において、腫瘍組織辺縁における CD16 抗体陽性好中球の集積は領域内リンパ節転移と強く相関し、5 年生存率が有意に低かった。また、リンパ節転移陽性患者において腫瘍内部と腫瘍辺縁を比較したとき、CD16b 抗体陽性好中球は腫瘍辺縁に多く集積する傾向があることがわかった。これにより胸部食道扁平上皮癌における領域内リンパ節転移には腫瘍辺縁への好中球の集積が関与しているということが示唆された。腫瘍周囲集積好中球はリンパ節転移診断・予後予測等に応用できる可能性があり、将来的に食道扁平上皮癌の治療にも応用できることが期待される。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査： 大森泰文

申請者： 藤田 啓

論文題名： Peritumoral CD16b positive-neutrophil accumulation strongly correlates with regional lymph node metastasis in thoracic esophageal squamous cell cancer
(和訳) 腫瘍辺縁の CD16b 陽性好中球の集積は胸部食道扁平上皮癌の領域内リンパ節転移と強く相関する

要旨

著者は、食道癌の領域リンパ節転移が腫瘍辺縁への好中球集積と関与しているという知見を、先行する動物実験により得ており、これを臨床病理学的に検証しようとした。秋田大学医学部附属病院で 2010 年から 2019 年までの間に、根治手術が行われた胸部食道扁平上皮癌患者で、術前治療症例を除く、126 名の腫瘍組織検体から作製したパラフィンブロックを用いて、腫瘍辺縁及び内部に浸潤する好中球の面積当たりの細胞密度を計測した。その際、画像解析で定量し易くするために、好中球に特異的に発現する CD16b を特異的抗体で免疫染色し定量化した。この結果、胸部食道扁平上皮癌において、腫瘍組織辺縁における好中球の集積が領域内リンパ節転移と強く相関し、5 年生存率が有意に低いことを明らかにし、腫瘍周囲集積好中球がリンパ節転移診断・予後予測に応用できる可能性を示唆した。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

好中球は分葉核という、きわめて特異的な核形態をしており、一般的なヘマトキシリン・エオシン染色で容易に同定可能である。しかしながら核が様々なパターンで分葉化しており、かつ血球ゆえに細胞質が乏しいという好中球の特徴のために、好中球が密に集積した際には

細胞境界を同定しにくくなり、密に集積した好中球の数を正確に測定することが困難になってしまう。そこで、著者は CD16b 抗体による免疫染色を施行することで、陽性シグナルを面積として捉えることで、画像解析ソフトで定量化することに成功した。このアイデアは診断の機械化を見据えており、斬新なものと考えられる。

2) 重要性

著者は CD16b 抗体で免疫染色をすることで、容易に腫瘍辺縁集積好中球を定量できることを示した。また、この方法を用いて、腫瘍組織辺縁における好中球の集積が領域内リンパ節転移と強く相関し、5 年生存率が有意に低いことを明らかにした。したがって、著者の方法は胸部食道扁平上皮癌のリンパ節転移診断・予後予測に応用できることを示唆しており、臨床的に大変有用な研究といえる。

3) 研究方法の正確性

本研究に使用した検体は術前治療症例を除いており、治療の影響を排除した条件で統一していることから、腫瘍辺縁への好中球浸潤と領域内リンパ節転移の関係を正確に反映している。CD16b は通常の臨床検査で血球分画を解析する際にフローサイトメトリーで好中球マーカーとして使用されているものであり、免疫染色でも信頼された特異的な汎好中球マーカーである。統計学的検討も正しくなされており、客観的な評価法で、正確性があると考えられる。

4) 表現の明瞭さ

研究目的、方法、実験結果、考察を簡潔、明瞭に記載していると考ええる。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。